

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CASSILÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO FUNGO *Aspergillus flavus***

**GABRIEL BROM VILELA**

CASSILÂNDIA – MS  
AGOSTO/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CASSILÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO FUNGO *Aspergillus flavus***

**GABRIEL BROM VILELA**

**Orientador: Prof. Dr. Gustavo Haralampidou da Costa Vieira**

**Coorientador: Prof. Dr. Eric Mateus Nascimento de Paula**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, com área de concentração em Sustentabilidade na Agricultura.

CASSILÂNDIA – MS

AGOSTO/2023

---

V755u Vilela, Gabriel Brom

Uso de óleos essenciais no controle do fungo *Aspergillus flavus* / Gabriel Brom  
Vilela. – Cassilândia, MS: UEMS, 2023.  
48 p.

Dissertação (Mestrado) – Agronomia (Sustentabilidade na Agricultura) –  
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Haralampidou da Costa Vieira  
Coorientador: Prof. Dr. Eric Mateus Nascimento de Paula

1. Ação inibitória 2. Antimicrobiano 3. Aspergilli 4. Óleos volatéis 5. Óleos vegetais  
I. Vieira, Gustavo Haralampidou da Costa II. Título

CDD 23. ed. 615.321



Governo do Estado de Mato Grosso do Sul  
**Fundação Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul**  
PROPP - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
UEMS - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Sede Dourados  
UUCass - Unidade Universitária de Cassilândia  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
PGAC - Área de Concentração em Sustentabilidade na Agricultura



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO FUNGO *Aspergillus flavus*"**

**AUTOR: GABRIEL BROM VILELA**

**ORIENTADOR: GUSTAVO HARALAMPIDOU DA COSTA VIEIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção de MESTRE EM AGRONOMIA, Área de concentração: "**Sustentabilidade na Agricultura**", pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Gustavo Haralampidou da Costa Vieira  
Orientador

Prof. Dr. Eduardo Pradi Vendruscolo - UEMS  
Participação via Webconferência

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ariana Bertola Carnevale - UNIFIMES  
Participação via Webconferência

Data da realização: 30 de agosto de 2023.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a minha dissertação ao meu companheiro Eric Mateus Nascimento de Paula, que foi o meu maior incentivador e apoiador, além do suporte incondicional que me deu durante todo o processo do mestrado. Além de me inspirar em ser uma pessoa melhor e correr atrás dos meus sonhos.

Dedico aos meus pais, Áureo Joaquim Resende Vilela e Maria Emília Brom Vilela, aos meus afilhados Sofia Oliveira Vilela e Bruno Guilherme Oliveira Vilela.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de ter me proporcionado realizar um dos meus sonhos, que é a conclusão do mestrado. A minha família pelo apoio e pelo amor durante essa etapa.

Agradeço a Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) e todos os excelentes profissionais que tive o privilégio de ter encontrado, desde os professores da pós-graduação a equipe administrativa e todos os colaboradores da instituição. Aqui pude aprender e desenvolver a minha jornada, enriquecendo com conhecimento para ser um profissional melhor.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Haralampidou da Costa Vieira, e ao meu coorientador Prof. Dr. Eric Mateus Nascimento de Paula, pela dedicação, paciência e principalmente pelo ensinamento que foi passado durante todo o período do mestrado. Sem o apoio deles, este trabalho não seria realizado. A eles, minha eterna gratidão e meu muito obrigado.

Agradeço a pesquisadora Fabiana, vinculada ao laboratório da UEMS - Cassilândia, que mesmo longe pode me ajudar no momento da execução do projeto, sanando minhas dúvidas.

Agradeço aos colegas da pós-graduação, em que alguns viraram amigos, e contribuíram no decorrer do processo de forma direta e indireta.

Agradeço também ao Prof. Dr. Ariel Eurides Stela, da Universidade Federal de Jataí – UFJ, por fornecer o microrganismo testado aqui nesta pesquisa; e a Enfermeira Maysa Resende que disponibilizou o laboratório de práticas funcionais do Centro Universitário de Mineiros – UNIFIMES para que eu executasse o projeto.

Agradeço minha prima Evelline Brom Dourado que me incentivou e, em alguns momentos, viajava junto até Cassilândia para as aulas do mestrado, me fazendo companhia na estrada.

Agradeço ao meu irmão Guilherme Brom Vilela e minha cunhada Glenda Vaz Oliveira Vilela, pela preocupação e zelo.

A todos um muito obrigado!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1. ASPECTOS GERAIS DA CONTAMINAÇÃO DE GRÃOS DE ARMAZENAMENTO POR <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> E O USO DE ÓLEOS ESSENCIAS PARA O SEU CONTROLE.....</b>	<b>13</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	14
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
1.3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.3.1 Características dos <i>Aspergillus</i> e do <i>Aspergillus flavus</i> .....	16
1.3.2 Impactos da contaminação do <i>Aspergillus flavus</i> em grãos de armazenamento.....	18
1.3.3 Óleos essenciais no controle do <i>Aspergillus flavus</i> .....	20
1.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
<b>CAPÍTULO 2. AÇÃO ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i>.....</b>	<b>34</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	35
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.2.1 Obtenção do patógeno.....	36
2.2.2 Obtenção dos óleos essenciais.....	36
2.2.3 Ação fungicida dos óleos essenciais.....	36
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
2.4 CONCLUSÕES.....	48
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Crescimento micelial (mm) in vitro de *Aspergillus flavus* observado 120 horas de incubação me meio de cultura acrescido de diferentes óleos essenciais. Mineiros/GO, 2023.....**34**
- Tabela 2.** Crescimento micelial (mm) in vitro de *Aspergillus flavus* observado 144 horas de incubação me meio de cultura acrescido de diferentes óleos essenciais. Mineiros/GO, 2023.....**38**
- Tabela 3.** Crescimento micelial (mm) in vitro de *Aspergillus flavus* observado 168 horas de incubação me meio de cultura acrescido de diferentes óleos essenciais. Mineiros/GO, 2023.....**41**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Pogostemon cablin*. .....**35**
- Figura 2.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* .....**35**
- Figura 3.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Mentha crispata*.....**36**
- Figura 4.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Santalum album*.....**36**
- Figura 5.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Cananga odorata*.....**37**
- Figura 6.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Pogostemon cablin* .....**39**
- Figura 7.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*.....**39**
- Figura 8.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Mentha crispata*.....**40**

- Figura 9.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Santalum album*.....**40**
- Figura 10.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Cananga odorata*.....**41**
- Figura 11.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Pogostemon cablin*.....**42**
- Figura 12.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*.....**43**
- Figura 13.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Mentha crispata*.....**43**
- Figura 14.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Santalum album*.....**44**
- Figura 15.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Cananga odorata*.....**44**

## INTRODUÇÃO GERAL

O armazenamento de grãos é uma atividade importante na cadeia de suprimentos agrícolas. Os grãos são colhidos e armazenados para preservar sua qualidade e garantir a disponibilidade durante todo o ano, sendo esse procedimento de extrema importância para os agricultores, comerciantes e consumidores. Há vários métodos de armazenamento de grãos, incluindo silos de aço, silos de concreto, sacos de tecido e barris de madeira. Cada método tem suas próprias vantagens e desvantagens, como custo, capacidade, durabilidade e eficiência na preservação dos grãos.

A contaminação fúngica em grãos armazenados pode causar vários problemas, incluindo a deterioração da qualidade (aparência, cor, odor, sabor e textura dos grãos), tornando-os impróprios ao consumo humano ou animal; essa deterioração implica também na diminuição da vida útil de armazenamento; perda econômica, pois a atividade fúngica pode resultar em perda de peso dos grãos, o que significa uma perda de rendimento para o agricultor.

O *Aspergillus* é uma das principais fontes de contaminação de grãos armazenados, e seu controle é importante para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos. Insetos podem introduzir o fungo *Aspergillus* nos grãos e favorecer sua proliferação. O controle de insetos é, portanto, uma medida importante para prevenir a contaminação por *Aspergillus*. O *Aspergillus flavus* é um fungo que pode causar problemas graves em grãos de armazenamento, como milho, soja e algodão. Esse fungo produz micotoxinas, substâncias tóxicas que podem ser perigosas para a saúde humana e animal, que afetam a qualidade dos grãos, tornando-os impróprios para o consumo ou para a venda.

O armazenamento inadequado dos grãos, com umidade elevada e temperatura inadequada, pode favorecer a proliferação do fungo e aumentar os riscos de contaminação por micotoxinas. Por isso, é importante adotar medidas para prevenir a contaminação fúngica em grãos de armazenamento, como o controle de umidade, a inspeção regular e a remoção de grãos contaminados. Em geral, é importante seguir boas práticas de armazenamento e manuseio de grãos para prevenir a contaminação por *Aspergillus* e garantir a segurança alimentar. Além disso, é importante realizar regularmente testes de amostras de grãos para detectar a presença de fungos, incluindo *Aspergillus*. Os grãos devem ser mantidos em condições secas e bem ventiladas pode ajudar a impedir o crescimento de *Aspergillus*. Ainda, algumas técnicas de tratamento podem ser levadas em consideração, como o tratamento térmico e o uso de fungicidas. Recentemente, uma nova estratégia versa pelo uso dos óleos essenciais para o controle desse grupo fúngico.

Os óleos essenciais, substâncias altamente concentradas, são encontradas em plantas e podem ser usados como alternativas aos fungicidas químicos, para o controle de fungos em grãos de armazenamento. Estudos têm evidenciado a eficiência de óleos essenciais de eucalipto, cravo, tomilho e nim (neem) na prevenção ou no controle de algumas doenças fúngicas em grãos, como exemplo, podem ser eficazes no controle *A. flavus*. No entanto, é importante destacar que o uso deste controle biológico no controle de patógenos em alimentos ou grãos armazenados deve ser feito com precaução, pois a eficácia varia com base na espécie de fungo, tipo de grão, concentração de óleo, método de aplicação e outros fatores.

No entanto, é importante destacar que ainda há uma falta de dados consistentes e confiáveis sobre sua eficácia no controle de fungos em grãos de armazenamento, devido à grande variação de dosagem. Portanto, é importante lembrar que o uso de óleos essenciais para o controle de fungos em grãos de armazenamento ainda está em fase experimental e requer mais pesquisas para determinar sua eficácia e segurança a longo prazo. É sempre recomendável consultar um profissional ou um especialista em agricultura, antes de usar qualquer produto para controle de doenças em grãos de armazenamento.

Desse modo, é necessário a continuidade de pesquisas com óleos essenciais para avaliar a sua eficácia no controle do *A. flavus* em grãos armazenados, bem como para identificar as doses mais eficazes e as melhores formas de aplicação. Além disso, é importante avaliar a segurança dos óleos essenciais para os alimentos e para a saúde humana, uma vez que alguns óleos podem ser tóxicos em altas doses.

## **CAPÍTULO 1. ASPECTOS GERAIS DA CONTAMINAÇÃO DE GRÃOS DE ARMAZENAMENTO POR *Aspergillus flavus* E O USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O SEU CONTROLE**

**RESUMO:** O gênero *Aspergillus* é um grupo de fungos comum em grãos de armazenamento, podendo produzir metabólitos secundários tóxicos que contaminam alimentos e rações. Composto por mais de 300 espécies, divididas em 19 seções, algumas são benéficas para a agricultura, biotecnologia, indústria alimentícia e saúde humana, enquanto outras deterioram produtos agrícolas e produzem micotoxinas prejudiciais, como o *A. flavus*. A indústria utiliza antifúngicos para combater o crescimento do fungo, mas isso levou ao aumento da resistência aos antifúngicos e preocupações com a segurança alimentar. O uso de pesticidas químicos sintéticos e o alto custo para sua produção levam à busca de métodos alternativos. Assim, o objetivo do presente estudo é elucidar, por meio de uma revisão de literatura, as principais e mais atuais abordagens profiláticas, contra *A. flavus* em grãos armazenados, por meio do uso de óleos essenciais. Portanto, os óleos essenciais se destacam como uma abordagem viável no controle de fungos, podendo representar uma importante estratégia para promover a segurança alimentar e a saúde pública. Ao continuar a explorar suas propriedades antimicrobianas e aperfeiçoar sua aplicação, podemos almejar uma solução mais sustentável e eficaz para proteger nossos alimentos dos desafios causados por microrganismos indesejados.

**PALAVRAS-CHAVE:** agricultura biodinâmica, *Aspergilli*, atividade antifúngica, compostos naturais, controle biológico.

### **GENERAL ASPECTS OF *Aspergillus flavus* CONTAMINATION IN STORED GRAINS AND THE USE OF ESSENTIAL OILS FOR ITS CONTROL**

**ABSTRACT:** The *Aspergillus* genus is a common group of fungi found in stored grains, capable of producing toxic secondary metabolites that contaminate food and feed. Comprising over 300 species, divided into 19 sections, some are beneficial for agriculture, biotechnology, the food industry, and human health, while others deteriorate agricultural products and produce harmful mycotoxins, such as *A. flavus*. The industry uses antifungals to combat fungal growth, but this has led to an increase in resistance to agricultural pesticides/fungicides and concerns about food safety. The use of synthetic chemical pesticides and the high cost of their production have led to the search for alternative methods. Thus, the objective of this study is to elucidate, through a literature review, the main and most current prophylactic approaches against *A. flavus*

in stored grains, using essential oils. Therefore, essential oils stand out as a viable approach to fungal control, representing an important strategy to promote food safety and public health. By continuing to explore their antimicrobial properties and refining their application, we can aim for a more sustainable and effective solution to protect our food from challenges posed by undesirable microorganisms.

**KEYWORDS:** biodynamic agriculture, *Aspergilli*, antifungal activity, natural compounds, biological control.

## 1.1 INTRODUÇÃO

O armazenamento de grãos e sementes é de extrema importância e necessidade para garantir a segurança alimentar, a preservação da biodiversidade agrícola e o desenvolvimento sustentável da agricultura. Os grãos e sementes são consumidos em todo o mundo, pois são a base da dieta humana e animal, constituem a base econômica para os países essencialmente agrícolas. Durante o período de armazenamento, os grãos estão expostos a ataques por agentes bióticos, afetando a qualidade e causando prejuízos econômicos (Tang et al., 2018). O dano causado por microrganismos, especialmente fungos, em produtos armazenados, gera perdas anuais estimadas entre 50 e 80% (Negasa et al., 2019) da produção agrícola global. Na maioria dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, as perdas variam de 15 a 50% da produção total de grãos, enquanto nos países menos desenvolvidos as perdas são bem maiores (Ribeiro et al., 2018).

Fungos patogênicos são responsáveis pelos danos qualitativos e quantitativos em grandes cultivos, reduzindo a produção de milho e trigo, por exemplo, em até 20%, em relação ao armazenamento (Božik et al., 2017). A contaminação fúngica, uma das principais razões para a redução de produtividade no armazenamento, pode aparecer durante a colheita ou na unidade de armazenamento. O dano qualitativo está associado à perda de poder germinativo e vigor das sementes, descoloração dos grãos, odor desagradável e contaminação com micotoxinas. A presença de micotoxinas representa o principal problema causado por fungos em cereais armazenados, mesmo em baixas concentrações, grãos contaminados não podem ser consumidos por humanos e animais. O dano quantitativo está relacionado à deterioração dos grãos e, conseqüentemente, a pesos baixos (Venkatesh et al., 2017).

Quanto a contaminação, aproximadamente 25 a 50% de todos os alimentos produzidos mundialmente estão contaminados com alguma classe de micotoxina. Entre os patógenos produtores de micotoxinas economicamente significativos estão espécies do gênero

*Aspergillus*, com destaque para o *Aspergillus flavus* (Moghadam et al., 2016; Kumar et al., 2017).

A presença de fungos e micotoxinas em grãos é controlada preventivamente, para evitar a contaminação antes do armazenamento (García-Díaz et al., 2019). Os fungicidas sintéticos, principalmente os benzimidazóis, são os mais comumente utilizados para este propósito (Boukaew et al., 2017). A aplicação de fungicidas no campo ocorre logo após a colheita. Embora seja possível aplicá-los nas unidades de armazenamento, é importante considerar que o uso desses produtos nesse ambiente pode afetar negativamente a qualidade do grão, representar riscos para a saúde animal e humana, além de favorecer a seleção de cepas resistentes aos fungicidas (Anžlovar et al., 2017; Souza et al., 2020).

Produtos ambientalmente sustentáveis têm sido estudados para evitar a contaminação fúngica em grãos e sementes, tornando-se mais seguros para produtores e consumidores. Uma alternativa promissora é o uso de óleos essenciais (OE) de plantas aromáticas, medicinais e/ou especiarias, que contêm compostos bioativos, como terpenos, com atividade antifúngica (Borges et al., 2018; García-Díaz et al., 2019). A atividade biológica dos OE é devida a substâncias voláteis de baixo peso molecular presentes em várias partes da planta. As principais vantagens dos OE em relação aos fungicidas sintéticos incluem diferentes modos de ação, seleção reduzida de cepas resistentes, biodegradabilidade, menor toxicidade para mamíferos, menor impacto ambiental e maior aceitação social (Perczak et al., 2019; García-Díaz et al., 2019; Souza et al., 2020; Pizzolitto et al., 2020).

Embora algumas pesquisas tenham sido realizadas sobre o uso de óleos essenciais para controlar *Aspergillus* e o *A. flavus*, é importante destacar que ainda há muitas lacunas no conhecimento sobre o assunto. Por exemplo, a maioria dos estudos se concentra em testes *in vitro*, ou seja, em tubos de ensaio, e é necessária mais pesquisa para avaliar a eficácia dos óleos essenciais em ambientes mais complexos, como em alimentos e em animais. Desta forma, o objetivo do presente estudo é elucidar as principais e mais atuais abordagens profiláticas, contra *A. flavus* em grãos de armazenamento, por meio do uso de óleos essenciais.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa qualitativa, de natureza básica e exploratória, por meio de uma pesquisa bibliográfica. Foram consultadas as bases de dados científicas relevantes para a pesquisa na área, como PubMed, Scopus, Web of Science, Agricola, AGRIS, Google Acadêmico e Periódicos Capes. Foram selecionados os termos de busca apropriados e relevantes, os quais foram utilizados de maneira isolada ou em combinação entre si durante as

buscas, sendo eles: contaminação de grãos, óleos essenciais, *Aspergillus flavus*, controle de *Aspergillus flavus*, óleos essenciais antifúngicos, armazenamento de grãos, contaminação por micotoxinas, patógenos de grãos, efeitos dos óleos essenciais em grãos de armazenamento, controle de fungos em produtos agrícolas, e manejo de micotoxinas em grãos. A busca foi realizada nas bases de dados selecionadas, filtrando os resultados por ano, idioma e tipo de publicação, priorizando-se artigos científicos, em idioma inglês e com no máximo 22 anos de publicação.

### 1.3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.3.1 Características dos *Aspergillus* e do *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus* é um fungo onipresente, sendo comum na deterioração de grãos e, é encontrado tanto em grãos, quanto em produtos processados (Candlish et al., 2001). Este gênero também é responsável por produzir metabólitos secundários tóxicos, como aflatoxinas, que podem contaminar alimentos e rações infectados (Tian et al., 2023). O gênero *Aspergillus* compreende mais de 300 espécies, divididas em 19 seções (Samson et al., 2014). Entre elas, espécies fúngicas pertencentes à seção Flavi do *Aspergillus* são importantes para a agricultura, biotecnologia, indústria alimentícia e saúde humana (Frisvad et al., 2019). Várias espécies têm aplicações benéficas em alimentos fermentados, biotecnologia e farmacêutica (Park et al., 2017).

Em 1729, quando Micheli, um padre-micologista florentino, descreveu pela primeira vez o gênero *Aspergillus*, deu-lhe esse nome porque as características da estrutura portadora de esporos do gênero se assemelhavam a um aspergillum, um dispositivo usado pela Igreja Católica para borrifar água benta (Klich et al., 2002).

Este gênero é amplamente distribuído na natureza e é um dos gêneros de fungos mais importantes economicamente (Houbraken; Samson, 2011), tanto no sentido positivo quanto no negativo. A *Aspergilli* produz importantes produtos industriais, nomeadamente ácido cítrico, amilases, alimentos e bebidas asiáticos; e compostos farmacêuticos como lovastatina, antibióticos e agentes antitumorais e antifúngicos. Espécies deste gênero também são a principal causa de perda de produtos agrícolas, produzem várias micotoxinas que são prejudiciais a humanos e animais, deterioram quase qualquer tipo de material e são relatadas como produtoras de doenças humanas e animais (Klich et al., 2002). O gênero tem mostrado uma taxonomia dinâmica particular e compreende mais de quatrocentas espécies aceitas (Houbraken et al., 2020).

A maioria das espécies do gênero *Aspergillus* se reproduz através da produção de esporos liberados no ambiente. Algumas delas produzem esporos sexuais, mas a maioria se reproduz por meio de esporos assexuados conhecidos como conídios (Bennett, 2010; Ebbole, 2010). O esporo assexual é carregado no conidióforo, uma estrutura especializada. Os conídios têm uma parede celular espessa, tornando-os resistentes às condições ambientais e protegendo contra o sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, contêm metabólitos secundários, como melanina e micotoxinas, que desempenham papéis importantes na patogênese e desenvolvimento. A formação, maturação, dormência e germinação de esporos assexuados são controlados por fatores de transcrição e reguladores (Park et al., 2019; Baltussen et al., 2020; Blachowicz et al., 2020).

*Aspergillus flavus* é o segundo agente mais comum causando problemas de saúde. Juntamente com *A. flavus*, outras espécies pertencentes à seção Flavi também produzem várias micotoxinas que têm efeitos prejudiciais em humanos (Frisvad et al., 2019). *A. flavus* perde apenas para *Aspergillus fumigatus* em sua capacidade de causar infecção direta e doença sistêmica em humanos (Perrone et al., 2014).

O *A. flavus* é uma espécie morfológicamente complexa que é classificada em dois grupos com base no tamanho de seus escleródios: as cepas L (Grupo I) com escleródios >400 µm de diâmetro e as cepas S (Grupo II) com escleródios <400 µm de diâmetro (Horn, 2003). Ambas as cepas de *A. flavus* S e L produzem aflatoxinas B1 e B2, mas as cepas de *A. flavus* S também podem produzir aflatoxinas G1 e G2. As cepas S estão distribuídas geograficamente em todo o mundo. O estágio sexual de *A. flavus* foi recentemente identificado como *Petromyces*, onde as ascósporas foram encontradas para se desenvolver dentro dos escleródios (Horn; Moore; Carbone, 2009).

*A. flavus* é um fungo facultativo que naturalmente existe como saprófito do solo e contamina vários cultivos importantes tanto nas fases pré quanto pós-colheita. O fungo causa doenças em culturas agrícolas, como semente de algodão, milho, amendoim e nozes, além de ser um patógeno oportunista em animais e humanos que causa doenças de aspergilose (FOUNTAIN et al., 2014). *A. flavus* produz a aflatoxina, que é um metabólito secundário policetídeo carcinogênico e mutagênico. A contaminação por aflatoxina representa uma preocupação mundial com a segurança dos alimentos que afeta tanto a comercialização quanto a segurança de múltiplos cultivos (Amaike; Keller, 2011).

As perdas econômicas globais devido à sua contaminação foram estimadas em centenas de milhões de dólares, sendo milho e amendoim são os cultivos alimentares mais afetados. Por exemplo, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA estima que a contaminação por

aflatoxina apenas no milho pode causar perdas anuais para a indústria alimentícia variando de 52,1 milhões de dólares a 1,68 bilhão de dólares. Embora a maioria dos fungos aflatoxigênicos cresça comumente em climas tropicais e subtropicais, as zonas com risco de contaminação por aflatoxina perene expandiram-se devido às mudanças climáticas globais. *A. flavus* e a contaminação por aflatoxina são previstas para representar ameaças graves para muitos países e regiões no futuro próximo (Baranyi; Kocsubé; Varga, 2015).

Esse microrganismo também coloniza o solo e decompõe a vegetação, o que torna quase impossível evitar a exposição a este fungo em casa, no local de trabalho ou até mesmo durante hospitalizações (Amaike; Keller, 2011). De fato, *A. flavus* é também isolado comparativamente com uma frequência maior de infecções por aspergilose em humanos, especialmente em países em desenvolvimento (Bartoletti et al., 2021).

O controle de *A. flavus* e contaminação por aflatoxinas geralmente se concentra na inibição do desenvolvimento de esporos e micélio e/ou na inativação de aflatoxinas por sua transformação em compostos não tóxicos. Esses processos dependem principalmente de abordagens químicas e físicas, incluindo o uso de fungicidas sintéticos, fumigação com ozônio, irradiação, processo de cozimento e manipulação de fatores ambientais durante a colheita e armazenamento. A maioria das estratégias atuais é cara, demorada e ineficiente, enquanto algumas não conseguem proteger o alimento sem causar grandes mudanças em suas propriedades físicas e uma séria perda de valor nutritivo. A aplicação contínua de fungicidas sintéticos ainda é o recurso mais eficaz e amplamente utilizado para controlar *A. flavus* e contaminação por aflatoxinas (Prakash et al., 2010).

### ***1.3.2 Impactos da contaminação do Aspergillus flavus em grãos de armazenamento***

A indústria de alimentos rastreia continuamente grãos e produtos de grãos armazenados quanto à presença desses fungos e combate seu crescimento usando antibióticos sintetizados quimicamente para controlar a deterioração dos alimentos (Moon et al., 2016). *A. flavus* é um dos principais fungos virulentos de milho e amendoim durante a colheita, frequentemente associado à produção da aflatoxina, o carcinógeno mais potente da natureza, causando grandes danos às culturas e perda econômica (Amaike; Keller, 2011).

No entanto, o uso generalizado desses produtos químicos levou a um aumento da resistência e isso impacta diretamente a saúde humana não apenas por limitar as opções de tratamento clínico, mas também devido aos antibióticos residuais presentes nos alimentos (Yang et al., 2020). Por exemplo, as questões de segurança alimentar aumentaram devido a microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos (Ju et al., 2020). Portanto, o

desenvolvimento de novos antimicrobianos eficazes, não tóxicos e inofensivos com propriedades biodegradáveis é necessário para preservar os alimentos e manter uma alta qualidade da saúde humana (Shan et al., 2007).

O *A. flavus* é um patógeno oportunista de culturas agrícolas, especialmente culturas que contêm óleo, como milho, amendoim e sementes de algodão. O fungo pode ser encontrado tanto no solo, na forma de conídios ou escleródios, quanto nos tecidos das plantas, onde se apresenta como micélio. Sua presença é amplamente distribuída em diversas zonas climáticas, sendo mais comum entre as latitudes 16° e 35°, em regiões de clima quente, enquanto é menos frequente acima das latitudes 45° (Klich, 2007). Os escleródios do fungo são capazes de sobreviver em condições ambientais severas no solo e podem dar origem a conídios e possivelmente ascósporos, o que leva a um aumento da população do fungo sob condições de clima quente e seco (Amaike; Keller, 2011).

Os escleródios germinam como micélios, que então formam conidióforos. A dispersão aérea de conídios está associada à infecção de culturas acima do solo, como milho e nozes, enquanto a movimentação do solo e a dispersão por respingos de chuva podem ser mais importantes para a infecção de sementes de amendoim e algodão. No caso do milho, o fungo coloniza o estigma e os grãos da planta. Os grãos jovens de milho são mais suscetíveis nos estágios de leite tardio a massa inicial. A incidência de colonização é maior na seda de espigas de milho maduras do que em espigas jovens (Cotty, 2001).

A colonização é aprimorada não apenas por ambientes favoráveis (quente e seco), mas também por danos de insetos e aves, que fornecem locais de entrada para o fungo. Danos de insetos estão associados a uma infecção aprimorada em todas as culturas. Insetos associados a infecções aprimoradas por *Aspergillus* incluem a lagarta-do-cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*), besouros nitidulídeos e gorgulho-do-arroz (*Sitophilus oryzae*) (Amaike; Keller, 2011).

A contaminação pós-colheita por aflatoxina de sementes também pode ser um grande problema devido a procedimentos inadequados de armazenamento, principalmente o excesso de umidade e atividade de insetos. É principalmente a contaminação pós-colheita que levou a surtos de aflatoxicose em várias partes do mundo e alimentos para animais (Amaike; Keller, 2011).

### ***1.3.3 Óleos essenciais no controle do *Aspergillus flavus****

Normalmente, patógenos pós-colheita são controlados por uma combinação de tecnologias de armazenamento, métodos físicos e fungicidas químicos sintéticos. No entanto, são necessários métodos alternativos de controle devido às percepções negativas do público sobre o uso de pesticidas, desenvolvimento de resistência aos fungicidas e alto custo para o desenvolvimento de novos conservantes químicos (Dikbas et al., 2008).

O impacto dos antifúngicos químicos na saúde justificou a implementação de medidas de proteção ao consumidor pelo estabelecimento de padrões máximos toleráveis em certas categorias de alimentos. No entanto, a existência desses padrões também tem importantes repercussões econômicas. Limitando o comércio de certas áreas onde a contaminação é prevalente e reduzindo significativamente o valor econômico de certa produção no caso de contaminação. Portanto, parece imperativo desenvolver meios de controle para prevenir a contaminação de alimentos por esses compostos tóxicos e/ou restringir seus efeitos tóxicos (Belasli et al., 2020).

Dentro desse escopo, metodologias baseadas no uso de compostos naturais, geralmente reconhecidos como não prejudiciais ao meio ambiente, bem como à saúde humana e animal, parecem interessantes (Miri et al., 2023). Há uma crescente preocupação em identificar compostos naturais capazes de limitar o crescimento e a biossíntese de micotoxinas. Esses compostos poderiam ser usados para combater a contaminação fúngica (Ben Miri et al., 2018).

As plantas desenvolveram vários compostos ativos com atividade biológica durante seu processo evolutivo, incluindo óleos essenciais (OEs), que têm potencial antimicrobiano que pode afetar o crescimento fúngico inibindo seu desenvolvimento (Anžlovar et al., 2017; Souza et al. 2020). Portanto, os OEs podem ser usados como uma alternativa às moléculas sintéticas para prevenir a contaminação fúngica e, conseqüentemente, a produção de micotoxinas (Morcia et al., 2017).

Os OEs são líquidos aromáticos voláteis obtidos a partir de metabólitos secundários das plantas, cuja atividade fungicida pode estar associada aos principais compostos presentes em sua composição química (Perczak et al., 2019; Souza et al., 2020). Esses compostos apresentam variabilidade qualitativa e quantitativa dependendo do clima, tipo de solo, parte da planta utilizada, idade da planta, variabilidade genética, quimiotipo, localização geográfica, estresses abióticos e bióticos, secagem e métodos de extração (Alonso-Gato et al., 2021).

A composição química dos OEs inclui um grande número de monoterpenos, que são substâncias de baixo peso molecular e, conseqüentemente, altamente voláteis (Reyes-Jurado et

al., 2015). Por essa razão, eles podem ser aplicados por diferentes métodos, incluindo contato e volatilização (Božik et al., 2017; Pedrotti et al., 2019). Como fungicidas fumigantes, a atividade antifúngica dos OEs pode estar relacionada à presença de monoterpenos na forma de vapor (Anžlovar et al., 2017; Moghadam et al., 2016).

O método de contato é mais eficaz do que o método de volatilização na inibição de patógenos, indicando que a atividade antifúngica dos OEs não está apenas associada a compostos voláteis (Zimmermann et al., 2023). Além do método de aplicação, outro fator a ser considerado é a variabilidade da composição química dos OEs e das concentrações utilizadas (Reyes-Jurado et al., 2015). A atividade antifúngica esteja principalmente relacionada à concentração do OE, as espécies e cepas testadas, bem como a composição química dos OEs, também influenciam a eficácia (Kumar et al., 2017).

Os OEs possuem diferentes mecanismos que atuam simultaneamente, pois consistem em vários compostos químicos, o que representa sua principal vantagem em relação aos fungicidas sintéticos (Tang et al., 2018; Pedrotti et al., 2019). Os OEs afetam a atividade enzimática dos fungos, impedindo seu crescimento, enquanto concentrações mais elevadas causam desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, levam à morte do patógeno (Rahman; Sarker, 2020).

O uso combinado dessas substâncias é uma estratégia de controle potencial, pois visa reduzir o risco de surgimento de cepas resistentes ou casos de resistência cruzada. Os OEs têm um grande número de mecanismos de ação, incluindo mudanças na permeabilidade da membrana celular; mudanças morfológicas em conidióforos e hifas, como perda de pigmentação e desenvolvimento anormal de conidióforos; mudanças nos sinais responsáveis pela transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva; mudanças nas propriedades físico-químicas; efeitos na morfogênese devido à interferência com as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular (Bomfim et al., 2020; Souza et al., 2020).

Os compostos naturais derivados de plantas ou OEs mais amplamente estudados contra *A. flavus* e a contaminação por aflatoxina em materiais alimentares são isolados de plantas como cravo (*Syzygium aromaticum L.*), canela (*Cinnamomum zeylanicum, C. verum*), orégano (*Origanum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgarisL.*). Essas plantas e seus OEs ou extratos têm sido usados na preparação de alimentos há séculos e são categorizados como "geralmente reconhecidos como seguros" (GRAS) pela FDA dos EUA. Além disso, muitos deles possuem efeitos benéficos no corpo humano, o que os torna fontes ideais de agentes seguros, naturais, antifúngicos e antiaflatoxigênicos (Tian et al., 2022).

Os OEs de *Cymbopogon nardus* e *Melaleuca alternifolia* foram eficientes in vitro contra *A. niger*, *A. nomius*, *A. flavuse* e *F. graminearum*, pois afetaram o crescimento micelial e a esporulação. Devido à sua atividade antifúngica, os OEs representam uma alternativa potencial e sustentável aos fungicidas sintéticos para proteção de grãos e sementes armazenados (Zimmermann et al., 2023).

Os agentes antifúngicos extraídos de diferentes plantas são altamente diversos. A maioria dos compostos naturais derivados de plantas que exibem atividade antifúngica são fenóis, terpenos e terpenoides. A atividade antimicrobiana dos fenóis está intimamente ligada ao seu grupo hidroxila, que é ligado diretamente a um anel de benzeno. A presença de um grupo hidroxila livre permite que os fenóis troquem seu próton, promovendo assim sua capacidade de modificar a integridade da membrana celular de microrganismos (Ben Arfa et al., 2006; Ojeda-Amador; Fregapane; Salvador, 2020).

Enquanto isso, a posição relativa do grupo hidroxila no anel de benzeno pode afetar potencialmente a eficácia antimicrobiana. Tian et al. (2023) investigaram as relações estrutura-atividade de flavonoides derivados de plantas contra o crescimento de *A. flavus* e biossíntese de aflatoxina. Flavonoides representam o maior grupo de compostos fenólicos naturalmente ocorrentes. Os mesmos autores identificaram que os grupos [-OH] ou [-O-CH<sub>3</sub>] na posição 6 do anel A e na posição 4 do anel B estão intimamente associados às atividades antifúngicas e antiaflatoxigênicas de flavonoides naturais.

Em relação aos terpenos, a conexão entre sua estrutura e grupos funcionais e suas atividades antimicrobianas permanece obscura. Anteriormente, o número de ligações duplas e estruturas acíclicas, monocíclicas e bicíclicas nos terpenos tem sido demonstrado como limitador de suas atividades antimicrobianas (Rao; Chen; McClements, 2019). Sugere-se que os terpenoides possuam atividades antimicrobianas maiores do que a maioria dos terpenos, e essas atividades são principalmente determinadas por seus grupos funcionais, como álcoois e aldeídos. Além disso, sua capacidade de ligação de hidrogênio e solubilidade relativa podem potencialmente afetar suas atividades antimicrobianas (Dorman; Deans, 2000).

A eficiência de compostos naturais derivados de plantas contra o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas é afetada por fatores ambientais, incluindo luz, oxigênio, pH, temperatura e atividade da água. A exposição à luz e altas quantidades de oxigênio na embalagem geralmente diminuem a eficiência antimicrobiana dos compostos naturais derivados de plantas, provavelmente devido à oxidação (Burt, 2004).

Os efeitos antimicrobianos de compostos naturais derivados de plantas tendem a aumentar à medida que os níveis de pH ambiental diminuem. A hidrofobicidade dos compostos

naturais derivados de plantas foi relatada como aumentando em níveis baixos de pH, uma vez que eles se dissolvem mais facilmente nos lipídios das membranas celulares microbianas. A temperatura é um fator chave no crescimento e produção de micotoxinas de *A. flavus*. A susceptibilidade dos microrganismos aos compostos naturais derivados de plantas geralmente aumenta à medida que as temperaturas de armazenamento diminuem. Enquanto isso, a capacidade antifúngica dos compostos naturais derivados de plantas é geralmente estável contra alterações de temperatura (Burt, 2004).

Além disso, as eficiências dos óleos essenciais no controle de fungos dependem intimamente da atividade de água do substrato. Geralmente, à medida que a atividade de água diminui, o crescimento fúngico é desfavorecido e a atividade antifúngica dos óleos essenciais é promovida. Os efeitos antiaflatoxigênicos dos óleos essenciais aumentam em atividades de água relativamente baixas (Passone; Girardi; Etcheverry, 2013).

As interações entre compostos naturais de origem vegetal individuais podem causar efeitos sinérgicos ou antagônicos. Por exemplo, diversos estudos relatam que uma mistura dos principais componentes de um óleo essencial exibe atividade antibacteriana mais fraca do que o óleo essencial completo, muito provavelmente devido à falta dos componentes restantes (Sarrazin et al., 2012).

Atualmente, a maioria dos estudos sobre os efeitos antifúngicos sinérgicos de compostos naturais de origem vegetal têm se concentrado nas interações de fenóis, terpenos e terpenoides. Os efeitos antifúngicos sinérgicos de diferentes óleos essenciais foram ainda relatados. Por exemplo, uma combinação de óleos essenciais de orégano e tomilho resultou em um efeito antifúngico sinérgico contra uma variedade de patógenos alimentares, incluindo *A. flavus*, *A. parasiticus* e *P. chrysogenum*. Além disso, misturas de óleos essenciais de *Mentha crispata* e melaleuca exibiram efeitos sinérgicos contra *A. niger* (Hossain et al., 2016). No entanto, continua sendo extremamente difícil prever a eficácia antimicrobiana de misturas de óleos essenciais, já que cada óleo essencial é uma mistura complexa de diferentes compostos químicos, e as interações entre os componentes individuais podem produzir tanto efeitos antimicrobianos sinérgicos quanto antagônicos (Goñi et al., 2009).

Os efeitos antifúngicos sinérgicos de compostos naturais derivados de plantas com fungicidas e medicamentos antifúngicos também foram relatados. Compostos naturais derivados de plantas são sugeridos para promover a atividade antifúngica de fungicidas e medicamentos, aumentando a biodisponibilidade dos medicamentos coadministrados em células fúngicas através da inibição de enzimas metabolizadoras e transportadores de múltiplas drogas ou de efluxo (Belofsky et al., 2013).

Compostos naturais derivados de plantas são capazes de aumentar a eficiência antifúngica, enquanto reduzem as quantidades necessárias para a inibição efetiva de contaminações e infecções fúngicas, e, portanto, podem reduzir os potenciais efeitos tóxicos. Portanto, compostos naturais derivados de plantas representam uma boa fonte de agentes combinados para tratamentos ou terapias antifúngicas. Estudos adicionais sobre os efeitos sinérgicos *in vivo* e *in situ* de compostos naturais derivados de plantas com fungicidas e medicamentos antifúngicos são de grande significado (Tian et al., 2022).

#### 1.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação dos grãos de armazenamento por fungos do gênero *Aspergillus* é um problema determinante, enfrentado por muitos produtores rurais e empresas agrícolas, afetando principalmente grãos como milho, amendoim, trigo, arroz, cevada e sorgo. Os fungos podem se desenvolver nos grãos armazenados, causando uma série de problemas que vão desde a perda de qualidade do produto até a sua total inutilização.

O *Aspergillus* é um fungo que pode produzir toxinas perigosas chamadas aflatoxinas, que são prejudiciais à saúde humana e animal. Os esporos de *Aspergillus* estão presentes no ambiente em que os grãos são armazenados e podem se multiplicar rapidamente em condições favoráveis, como umidade e temperatura elevada. Além disso, os danos físicos aos grãos, como rachaduras, podem criar um ambiente ideal para a multiplicação do *Aspergillus*. A contaminação dos grãos por *Aspergillus* pode levar a grandes prejuízos econômicos, uma vez que os grãos contaminados precisam ser descartados e não podem ser vendidos ou utilizados na alimentação humana ou animal. Além disso, a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas pode causar sérios danos à saúde, incluindo câncer de fígado, danos ao sistema nervoso e problemas gastrointestinais.

Uma possibilidade para o controle desse fungo, em grão de armazenamento, são os óleos essenciais. Os óleos essenciais são compostos voláteis extraídos de plantas que possuem propriedades antifúngicas e podem ser utilizados como alternativa para controlar a contaminação de grãos de armazenamento por *Aspergillus*. Diversos estudos têm investigado o potencial de óleos essenciais no controle de *Aspergillus* em grãos de armazenamento.

No entanto, é importante ressaltar que a eficácia dos óleos essenciais pode variar dependendo do tipo de grão, da espécie de *Aspergillus* e das condições de armazenamento. Em resumo, o uso de óleos essenciais pode representar uma alternativa promissora para o controle da contaminação por *Aspergillus* em grãos de armazenamento, porém, mais pesquisas são necessárias para determinar a eficácia e segurança desses compostos.

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-GATO, María et al. Essential oils as antimicrobials in crop protection. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 34, 2021.

AMAIKE, Saori; KELLER, Nancy P. A. flavus. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 107-133, 2011.

ANŽLOVAR, Sabina; LIKAR, Matevž; DOLENC KOCE, Jasna. Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. **Acta Botanica Croatica**, v. 76, n. 1, p. 64-71, 2017.

BALTUSSEN, Tim JH et al. Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus* spp. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 1, p. e00049-19, 2020.

BARANYI, Nikolett; KOCSUBÉ, Sándor; VARGA, János. Aflatoxins: Climate change and biodegradation. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 60-66, 2015.

BARTOLETTI, Michele et al. Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among intubated patients with COVID-19: a prospective study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 11, p. e3606-e3614, 2021.

BELASLI, Azem et al. Antifungal, antitoxigenic, and antioxidant activities of the essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.): Potential use as wheat preservative. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 9, p. 4717-4729, 2020.

BELOFSKY, Gil et al. Fungal ABC transporter-associated activity of isoflavonoids from the root extract of *Dalea formosa*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 5, p. 915-925, 2013.

BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BEN MIRI, Yamina; ARINO, Agustin; DJENANE, Djamel. Study of antifungal, anti-aflatoxigenic, antioxidant activity and phytotoxicity of Algerian Citrus limon var. Eureka and Citrus sinensis var. Valencia essential oils. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 2, p. 345-361, 2018.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*, p 1–17. **Aspergillus molecular biology and genomics**. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, 2010.

BLACHOWICZ, Adriana et al. Contributions of spore secondary metabolites to UV-C protection and virulence vary in different *Aspergillus fumigatus* strains. **MBio**, v. 11, n. 1, p. e03415-19, 2020.

BOMFIM, Natália da Silva et al. Antifungal and antiaflatoxigenic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *A. flavus*. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 1, p. 153-161, 2020.

BORGES, Darlan Ferreira et al. Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: A review. **Crop Protection**, v. 110, p. 135-140, 2018.

BOUKAEW, Sawai; PRASERTSAN, Poonsuk; SATTAYASAMITSATHIT, Supalak. Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *A. flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 558-566, 2017.

BOŽIK, Matěj et al. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 146-152, 2017.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CANDLISH, A. A. G. et al. A survey of ethnic foods for microbial quality and content aflatoxin. **Food Additives&Contaminants**, v. 18, n. 2, p. 129-136, 2001.

COTTY, P. J. Cottonseed losses and mycotoxins. **Compendium of Cotton Diseases**. Part, v. 1, p. 9-13, 2001.

DIKBAS, Neslihan et al. Control of *A. flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 179-182, 2008.

DORMAN, HJ–Deans; DEANS, Stanley G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

EBBOLE, Daniel J. The conidium. **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**, p. 577-590, 2010.

FOUNTAIN, Jake C. et al. Environmental influences on maize-*A. flavus* interactions and aflatoxin production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 40, 2014.

FRISVAD, Jens Christian et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, n. 1, p. 1-63, 2019.

GARCÍA-DÍAZ, Marta et al. A novel niosome-encapsulated essential oil formulation to prevent *A. flavus* growth and aflatoxin contamination of maize grains during storage. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 646, 2019.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.

HORN, Bruce W. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 22, n. 2-3, p. 351-379, 2003.

HORN, B.W.; MOORE, G. G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in *A. flavus*. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 423-429, 2009.

HOSSAIN, Farah et al. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. **Food Microbiology**, v. 53, p. 24-30, 2016.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, n. 1, p. 1-51, 2011.

HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v. 96, n. 1, p. 141-153, 2020.

JU, Jian et al. Synergistic inhibition effect of citral and eugenol against *Aspergillus niger* and their application in bread preservation. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125974, 2020.

KLICH, Maren A. *A. flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 6, p. 713-722, 2007.

KUMAR, Peeyush et al. In vivo and in vitro control activity of plant essential oils against three strains of *Aspergillus niger*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 21948-21959, 2017.

KRISHNAN, Suganthini; MANAVATHU, Elias K.; CHANDRASEKAR, Pranatharthi H. A. *A. flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 206-222, 2009.

LV, Xuan et al. Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity. **Environmental Pollution**, v. 222, p. 504-512, 2017.

MIRI, Yamina Ben et al. Potential of essential oils for protection of Couscous against *A. flavus* and aflatoxin B1 contamination. **Food Control**, v. 145, p. 109474, 2023.

MOGHADAM, Hadiyah Davoudi; SANI, Ali Mohamadi; SANGATASH, Masoomeh Mehraban. Antifungal activity of essential oil of *Ziziphora clinopodioides* and the inhibition of aflatoxin B1 production in maize grain. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 3, p. 493-499, 2016.

MOON, Young-Sun et al. Antifungal and antiaflatoxigenic methylenedioxy-containing compounds and piperine-like synthetic compounds. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 240, 2016.

MORCIA, Caterina; MALNATI, Mauro; TERZI, Valeria. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 3, p. 415-422, 2012.

NEGASA, F.; SOLOMON, A.; GIRMA, D. Effect of traditional and hermetic bag storage structures on fungus contamination of stored maize Grain (*Zea mays* L.) in Bako, Western Shoa, Ethiopia. **African Journal of Food Science**, v. 13, n. 3, p. 57-64, 2019.

OJEDA-AMADOR, Rosa M.; FREGAPANE, Giuseppe; SALVADOR, María Desamparados. Influence of cultivar and technological conditions on the volatile profile of virgin pistachio oils. **Food Chemistry**, v. 311, p. 125957, 2020.

PARK, Hee-Soo et al. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 100, p. 161-202, 2017.

PARK, Hee-Soo et al. Developmental decisions in *Aspergillus nidulans*. **Biology of the Fungal Cell**, p. 63-80, 2019.

PASSONE, María Alejandra; GIRARDI, Natalia Soledad; ETCHEVERRY, Miriam. Antifungal and antiaflatoxic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. **LWT-Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 434-444, 2013.

PEDROTTI, Carine; DA SILVA RIBEIRO, Rute Terezinha; SCHWAMBACH, Joseli. Control of postharvest fungal rots in grapes through the use of *Baccharis trimera* and *Baccharis dracunculifolia* essential oils. **Crop Protection**, v. 125, p. 104912, 2019.

PERCZAK, Adam et al. Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds. **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 1085-1097, 2019.

PIZZOLITTO, Romina P. et al. Quantitative-structure-activity relationship study to predict the antifungal activity of essential oils against *Fusarium verticillioides*. **Food Control**, v. 108, p. 106836, 2020.

PRAKASH, Bhanu et al. Efficacy of chemically characterized Piper betle L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 114-119, 2010.

RAO, Jiajia; CHEN, Bingcan; MCCLEMENTS, David Julian. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, p. 365-387, 2019.

RAHMAN, Mukhlesur; SARKER, Satyajit D. Antimicrobial natural products. In: **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. Academic Press, 2020. p. 77-113.

REYES-JURADO, Fatima et al. Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. **Food Engineering Reviews**, v. 7, p. 275-297, 2015.

RIBEIRO, Leandro Prado; LOVATTO, Maíke; VENDRAMIM, José Djair. Avaliação da eficácia de duas formulações comerciais de terra de diatomácea no controle do gorgulho-dormilho com base em parâmetros toxicológicos. **Agropecuária Catarinense**, v. 31, n. 1, p. 56-60, 2018.

SAMSON, Robert A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141-173, 2014.

SARRAZIN, Sandra Layse Ferreira et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1474-1478, 2012.

SHAN, Bin et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 112-119, 2007.

SOUZA, Diego P. et al. Fungicidal properties and insights on the mechanisms of the action of volatile oils from Amazonian Aniba trees. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111914, 2020.

TANG, Xi et al. Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*A. flavus* and *Aspergillus ochraceus*). **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2108, 2018.

TIAN, F et al. Antifungal Activity of Essential Oil and Plant-Derived Natural Compounds against *A. flavus*. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1727, 2022.

TIAN, Fei et al. Plant-based natural flavonoids show strong inhibition of aflatoxin production and related gene expressions correlated with chemical structure. **Food Microbiology**, v. 109, p. 104141, 2023.

VENKATESH, Hosur Narayanappa et al. Antifungal and antimycotoxigenic properties of chemically characterised essential oil of *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. sup2, p. 1856-1868, 2017.

YANG, Qiong et al. In vitro and in vivo antifungal activity and preliminary mechanism of cembratrien-diols against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112745, 2020.

ZIMMERMANN, Rubens Candido et al. Antifungal activity of essential oils and their combinations against storage fungi. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2023.

## CAPÍTULO 2. AÇÃO ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DO *Aspergillus flavus*

**RESUMO:** Observou-se um aumento no interesse pelos compostos orgânicos voláteis produzidos por plantas, que inibem o crescimento fúngico em produtos agrícolas. Esses compostos naturais, pouco tóxicos e altamente aplicáveis, incluindo alguns óleos essenciais, mostraram capacidade de combater a aflatoxina produzida por *Aspergillus*. Este estudo avaliou o potencial dos óleos essenciais para controlar o fungo *A. flavus*, visando opções antifúngicas na agricultura. Para tanto, utilizou-se os óleos essenciais de *Mentha crispata*, *Pogostemon cablin*, *Canangium odoratum*, *Santalum album* e *Copaifera langsdorffi*, em cinco concentrações (0, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ). O óleo de *Pogostemon cablin* apresentou o melhor desempenho em todas as dosagens. Os demais óleos apresentaram ação inibitória significativa a partir da dosagem de 20  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . Desta maneira, conclui-se que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* possui ação inibitória *in vitro* sobre o *A. flavus*, devendo ser direcionado para ações e pesquisas a campo ou *in vivo*.

**PALAVRA-CHAVE:** Ação inibitória; Antimicrobiano; *Aspergilli*; Óleos voláteis; Óleos vegetais.

### IN VITRO ANTIFUNGAL ACTION OF ESSENTIAL OILS IN THE CONTROL OF *Aspergillus flavus*

**ABSTRACT:** An increase in interest in volatile organic compounds produced by plants, which inhibit fungal growth in agricultural products, has been observed. These natural compounds, which are low in toxicity and highly applicable, including some essential oils, have shown the ability to combat aflatoxin produced by *Aspergillus*. This study evaluated the potential of essential oils in controlling the *A. flavus* fungus, aiming for antifungal options in agriculture. To do so, a research with a completely randomized experimental design was developed in a 5 x 5 factorial scheme (essential oils *Mentha crispata*, *Pogostemon cablin*, *Canangium odoratum*, *Santalum album*, and *Copaifera langsdorffii*) at five concentrations (0, 5, 10, 20, and 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ). The *Pogostemon cablin* oil showed the best performance at all dosages. The other oils exhibited significant inhibitory action from a dosage of 20  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . It can be concluded that the essential oil of *Pogostemon cablin* showed promising *in vitro* inhibitory action against *A. flavus*, and further research should be directed toward field or *in vivo* applications.

**KEYWORDS:** Inhibitory action; Antimicrobial; *Aspergilli*; Volatile oils; Vegetable oils.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies de fungos são prejudiciais ao ser humano, causando doenças, pois podem contaminar e eventualmente deteriorar alimentos armazenados. Quando o ser humano primitivo começou a cultivar plantações e armazenar alimentos, os fungos deteriorantes começaram a ser observados. Os fungos envolvidos na deterioração de grãos de cereais e outros produtos agrícolas são classificados como fungos de campo, fungos de armazenamento e fungos de decomposição avançada, dependendo do momento da contaminação. Os fungos de

armazenamento se desenvolvem posteriormente a colheita, transporte ou processamento (Aminu; Keta, 2021).

O desenvolvimento desses fungos pode ser afetado pelo teor de umidade do produto, temperatura, tempo de armazenamento, transporte e grau de contaminação fúngica antes do armazenamento, o que pode ser ampliado pela atividade de insetos, que favorecem a disseminação dos fungos (Keta et al., 2019). Os gêneros de fungos encontrados em grãos armazenados são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e algumas espécies xerofíticas, várias das quais podem produzir toxinas (Castellari et al., 2010).

Os fungos do gênero *Aspergillus* produzem metabólitos secundários, chamados aflatoxinas, que são responsáveis por causar uma variedade de efeitos tóxicos, incluindo hepatotoxicidade, teratogenicidade e mutagenicidade, causando sérios problemas de saúde como hepatite, hemorragias, câncer do trato urinário, danos renais, câncer de fígado, câncer esofágico, imunossupressão, dentre outros, em animais e no ser humano (Adeyeye, 2016).

As espécies de *Aspergillus* foram relatadas como os fungos mais comuns causando contaminação de produtos alimentares armazenados, como milho, amendoim, arroz e especiarias (Kro; Das; Tayung, 2017). Seus efeitos sobre os grãos incluem podridão, descoloração do grão, mofo, perda de matéria seca, diminuição da germinação, presença de micotoxinas, contribuindo para uma perda de mais de 50% de grãos de milho em países tropicais (Suleiman; Rosentrater; Bern, 2013).

Os óleos essenciais de plantas aromáticas ganharam considerável interesse, pois contêm compostos com propriedades antimicrobianas capazes de inibir e controlar o crescimento de patógenos fúngicos e bolores produtores de toxinas (Pandey et al., 2017).

Alguns óleos essenciais extraídos de plantas já foram identificados impedindo o crescimento e a ação da aflatoxina produzida por espécies de *Aspergillus* (Ramsdam et al., 2021). Desta forma, devido a necessidade de novas opções antifúngicas na agricultura, o presente estudo objetivou avaliar o potencial antifúngico de óleos essenciais no controle do *A. flavus*.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Mineiros, na cidade de Mineiros, no Estado de Goiás, em 2022.

### **2.2.1 Obtenção do patógeno**

O patógeno (*Aspergillus flavus*) foi obtido diretamente de laboratório especializado, que desenvolve culturas puras do microrganismo. As colônias puras foram mantidas em meio de cultura do tipo Ágar Batata Dextrose (BDA) sendo acondicionados em placas de petri que permaneceram em ambiente climatizado sob temperatura e fotoperíodo controlados. Essas colônias foram usadas para os testes com os óleos essenciais.

### **2.2.2 Obtenção dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais foram adquiridos diretamente de casas especializadas, sendo diluídos em água deionizada na concentração de 30%. A diluição do óleo em água foi feita adicionando-se uma gota de twim 80% a solução. Para este estudo foram usados os óleos essenciais de *Mentha crispata*, *Pogostemon cablin*, *Canangium odoratum*, *Santalum album* e *Copaifera langsdorffii*.

### **2.2.3 Delineamento experimental e avaliações**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5 (óleos essenciais de *Mentha crispata*, *Pogostemon cablin*, *Canangium odoratum*, *Santalum album* e *Copaifera langsdorffii*) em cinco concentrações (0, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ). A ação antifúngica dos óleos essenciais foi determinada inoculando-se o fungo proveniente das culturas puras ao meio BDA acrescido das substâncias nas diferentes concentrações. Essas substâncias foram adicionadas ao meio de cultura ainda fundente.

A ação fungicida dos óleos essenciais foi determinada a partir do crescimento das colônias, sendo este crescimento determinado através da média de duas medidas diametralmente opostas. Esses dados foram obtidos com o auxílio de um paquímetro, em que as avaliações foram realizadas a cada 24 horas até a colônia fúngica do grupo controle cobrir toda a placa. Com a média dos resultados obtidos foi determinado o índice da velocidade de crescimento micelial (IVCM) (OLIVEIRA, 1991).

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e nos resultados significativos as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo usado o programa estatístico SISVAR versão 5.0 (FERREIRA, 2019). Além disso, regressão do tipo quadrática.

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os óleos essenciais apresentaram atividade antifúngica *in vitro* sobre o fungo *A. flavus*, após 120 horas da repicagem. Para a menor dose testada, que corresponde a  $5 \mu\text{L.L}^{-1}$ , o óleo de *Pogostemon cablin* apresentou eficiência diferindo dos demais tratamentos. Essa mesma eficiência foi mantida na dose de  $10 \mu\text{L.L}^{-1}$ , onde *P. cablin* juntamente com o óleo de *Canangium odoratum* apresentaram os melhores resultados inibitórios, seguido por *Santalum album* e *Mentha crispata*. Nesta dose o óleo de *Copaifera langsdorffii* apresentou a menor eficiência dentre todos os óleos testados. Para as doses subsequentes, que correspondem a 20 e  $40 \mu\text{L.L}^{-1}$ , não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Crescimento micelial (mm) *in vitro* de *Aspergillus flavus* após 120 horas de incubação em meio de cultura acrescido de diferentes óleos essenciais. Mineiros/GO, 2023.

Óleos Essenciais	Crescimento micelial (mm)				
	Concentrações ( $\mu\text{L.L}^{-1}$ )				
	0	5	10	20	40
<i>Santalum album</i>	45,0a	41,2b	36,2b	29,8a	26,4 <sup>a</sup>
<i>Canangium odoratum</i>	45,0a	38,0b	33,6a	29,8a	27,0a
<i>Pogostemon cablin</i>	45,0a	33,0a	31,6a	31,0a	26,4 <sup>a</sup>
<i>Copaifera langsdorffii</i>	45,0a	40,6b	39,8c	33,4a	25,4 <sup>a</sup>
<i>Mentha crispata</i>	45,0a	39,2b	35,8b	31,2a	27,4 <sup>a</sup>

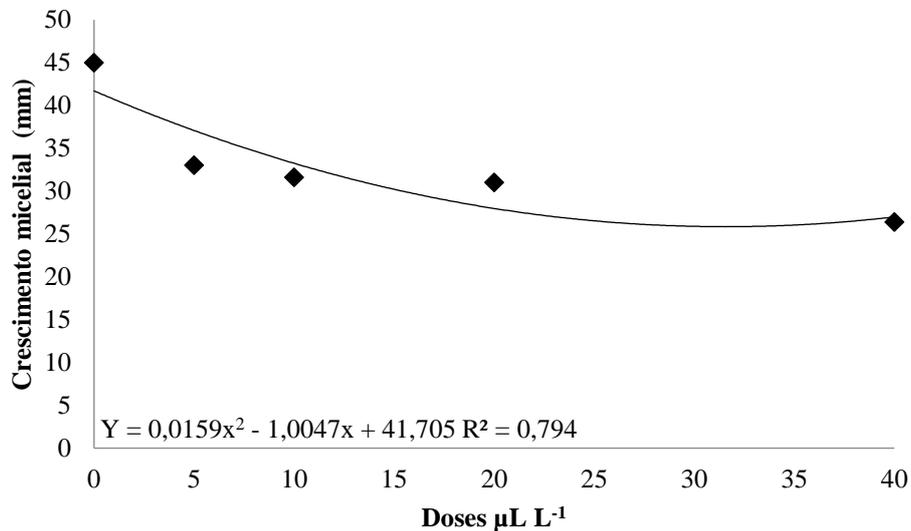
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Luchesi et al. (2022) sugerem que o óleo de *Pogostemon cablin* possui compostos que são altamente eficazes na inibição do crescimento fúngico mesmo em concentrações mais baixas.

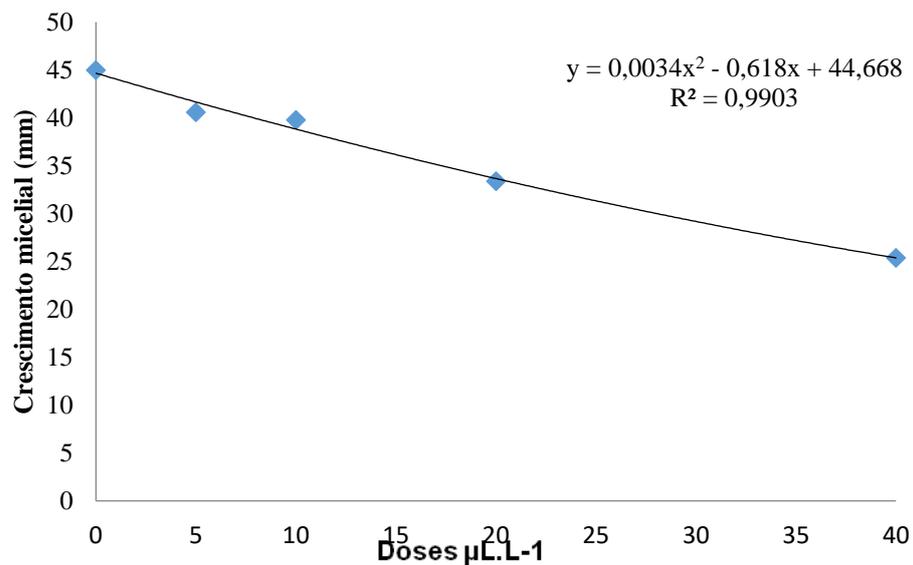
Com relação ao efeito inibitório do óleo de *Canangium odoratum*, o mesmo foi verificado a partir da dose de  $10 \mu\text{L.L}^{-1}$ . Neste sentido, Jantapan et al. (2017) analisaram as atividades antiaflatoxigênicas e antifúngicas deste mesmo óleo contra o *A. parasiticus* e *A. flavus*, em condições semelhantes as realizadas neste trabalho (ágar batata dextrose), obtendo resultados satisfatórios, com a inibição de crescimento e produção de aflatoxina B1 de *A. parasiticus* e apresentou também efeitos inibitórios em *A. flavus*. As atividades antiaflatoxigênicas do óleo essencial correlacionaram-se com suas atividades antifúngicas de forma dependente da dose.

Quando analisado o efeito da dose para cada substância separadamente, observa-se uma relação direta entre o aumento da dose e a redução do crescimento micelial fúngico para todas as substâncias testadas, sugerindo que todos os óleos possuem ação inibitória sobre o fungo. Neste período de avaliação, *Pogostemon cablin* apresentou o menor R<sup>2</sup>, que é explicado pela

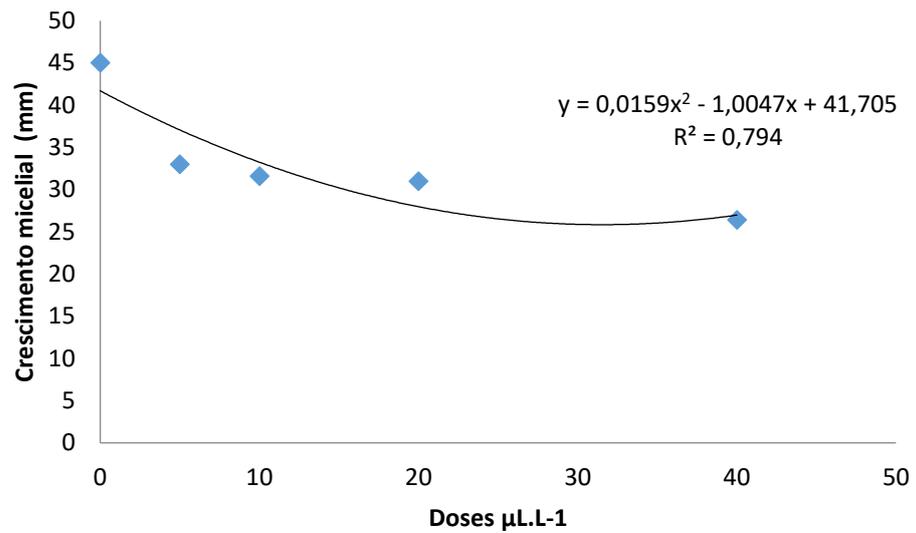
elevada eficiência inibitória desde a menor dose usada, que corresponde a  $5 \mu\text{L.L}^{-1}$ . Para os demais óleos a relação foi altamente significativa, chegando a valores de  $R^2$  acima de 90 para os óleos de *Copaifera angsdorffii*, *Mentha crispata*, *Santalum album* e (Figuras 1 a 5).



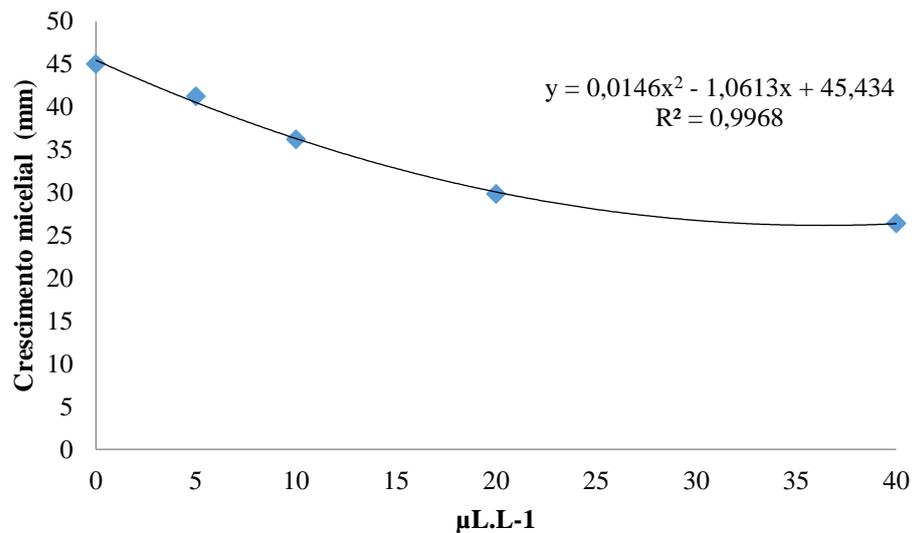
**Figura 1.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Pogostemon cablin*.



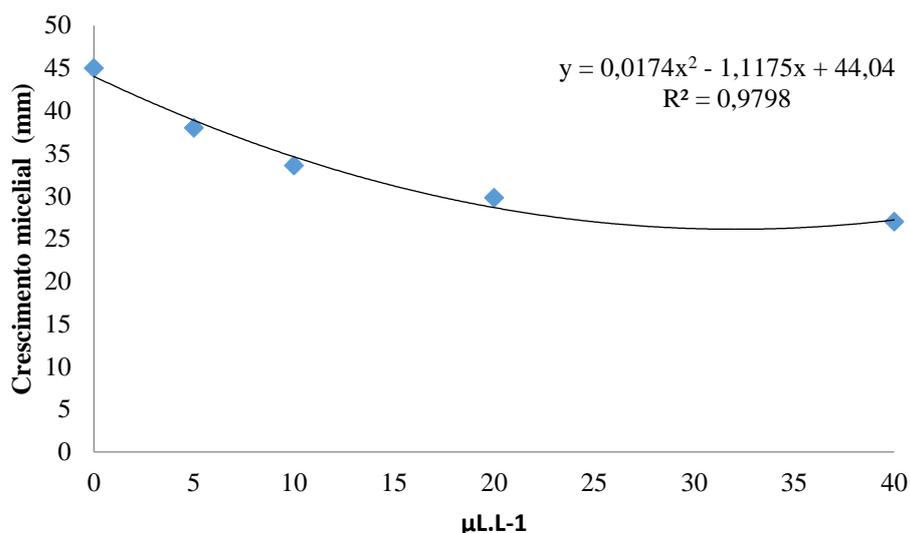
**Figura 2.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*.



**Figura 3.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Mentha crispata*.



**Figura 4.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Santalum album*.



**Figura 5.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 120 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Canangium odoratum*.

A ação inibitória dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial fúngico está relacionada à capacidade desses compostos de interagir com as células fúngicas e modificar seus processos metabólicos, resultando na redução do crescimento e proliferação do fungo. Quando a dose do óleo essencial é aumentada, a concentração desses compostos também aumenta, o que intensifica sua interação com as células fúngicas. Portanto, é esperado que um aumento da dose dos óleos essenciais leve a uma maior inibição do crescimento micelial fúngico (Mani-López; Cortés-Zavaleta; López-Malo, 2021).

No caso específico do óleo de *Pogostemon cablin*, apesar de apresentar uma relação dose-resposta menos linear em comparação com os outros óleos, ainda demonstrou uma alta eficiência inibitória desde a menor dose utilizada. Isso pode ser atribuído à presença de compostos específicos no óleo de *Pogostemon cablin* que possuem propriedades antifúngicas (Luchesi et al., 2022).

Possivelmente, a maior capacidade inibitória do *Pogostemon cablin* se deve a presença do pachypodol em sua composição. Esse é um composto flavonoide natural, que foi identificado em várias espécies de plantas, sendo a mais importante o *Pogostemon cablin*. Também foi relatado como tendo efeitos terapêuticos potenciais em certas doenças; juntamente com outros componentes químicos significativos, também contribui para a atividade biológica do *Pogostemon cablin* (Fátima et al., 2023).

Para a avaliação realizada 144 horas após a repicagem, o tratamento com o óleo essencial de *Pogostemon cablin* apresentou o menor crescimento micelial, sendo a maior

eficiência inibitória para as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . Este diferiu dos demais óleos. Novamente, para as concentrações de 20 e 40  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , nenhum óleo essencial diferiu dos demais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Crescimento micelial (mm) in vitro de *Aspergillus flavus* após 144 horas de incubação em meio de cultura acrescido de diferentes óleos essenciais. Mineiros/GO, 2023.

Óleos Essenciais	Crescimento micelial (mm)				
	Concentrações ( $\mu\text{L.L}^{-1}$ )				
	0	5	10	20	40
<i>Santalum album</i>	56,0a	49,4b	44,6a	36,0a	31,4 <sup>a</sup>
<i>Canangium odoratum</i>	56,0a	46,8a	42,2b	36,0a	31,8 <sup>a</sup>
<i>Pogostemon cablin</i>	56,0a	39,6c	36,8c	36,2a	31,2 <sup>a</sup>
<i>Copaifera langsdorffii</i>	56,0a	51,6b	46,6a	38,8a	30,2 <sup>a</sup>
<i>Mentha crispata</i>	56,0a	46,8a	42,6b	37,4a	32,4 <sup>a</sup>

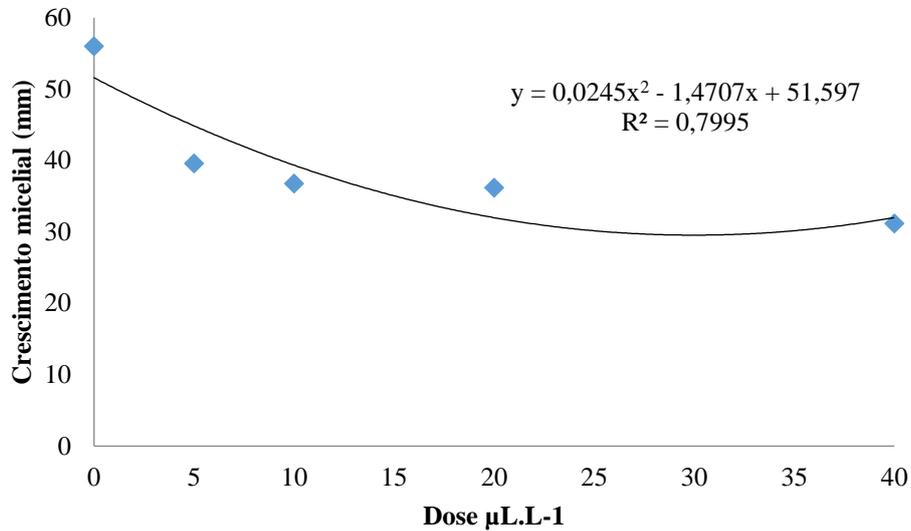
Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Um estudo recente analisou a atividade antifúngica de 60 óleos essenciais contra três espécies de fungos causadores de doenças: *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Descobriu-se que o óleo de *Pogostemon cablin* tinha notável atividade antifúngica contra *C. neoformans*. A atividade antifúngica também foi observada para *A. niger*. A eficácia do óleo da árvore do chá destaca sua capacidade de eliminar uma variedade de leveduras e fungos (Pareek et al., 2023).

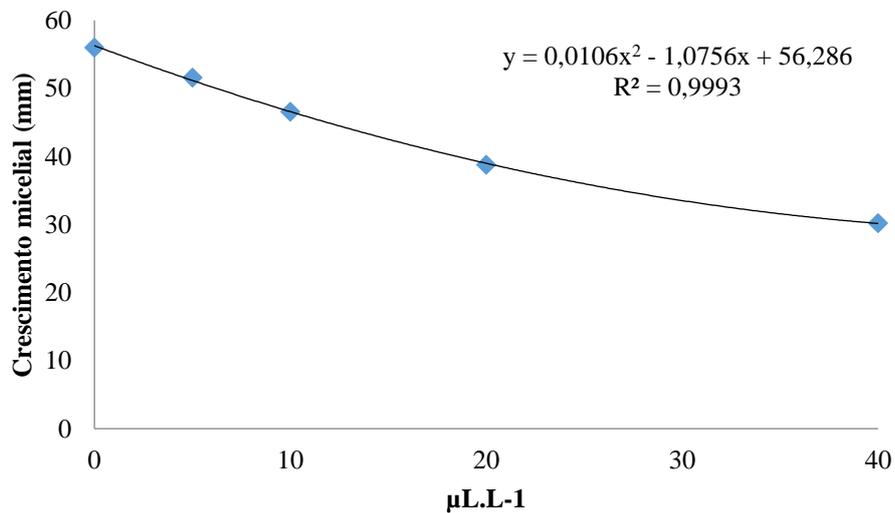
Quando avaliado o efeito da dose para cada substância testada, observa-se que todos os óleos testados apresentaram efeito inibitório sobre o fungo, havendo uma relação diretamente proporcional entre o aumento da dose e a redução do crescimento micelial fúngico. Assim como na avaliação anterior, *Pogostemon cablin* apresentou o menor valor de  $R^2$ , por apresentar o maior efeito inibitório a partir da menor dose testada (Figura 6). Os demais óleos usados apresentaram uma relação altamente significativa, tendo valores de  $R^2$  acima de 80%, sendo para *Copaifera langsdorffii* e *Santalum album* (99%) (Figuras 7 e 8), seguido por *Canangium odoratum* (98%) (Figura 9) e *Mentha crispata* (97%) (Figura 10).

No caso específico do óleo de *Copaifera langsdorffii*, sua baixa relação entre dose e efeito inibitório pode ser devido à composição específica de seus compostos, que podem não ser tão eficazes na inibição do crescimento fúngico ou podem exigir concentrações mais altas para demonstrar seu efeito inibitório completo. Tais dados, corroboram com o estudo desenvolvido por Nóbrega et al. (2019), em que o óleo de *Copaifera langsdorffii* apresentou inibição moderada, com percentuais médios variando de 26,6 a 33,68% para *Alternaria alternata* e 39,5 a 49,6% para *Colletotrichum musae*. Inclusive, as doses testadas no

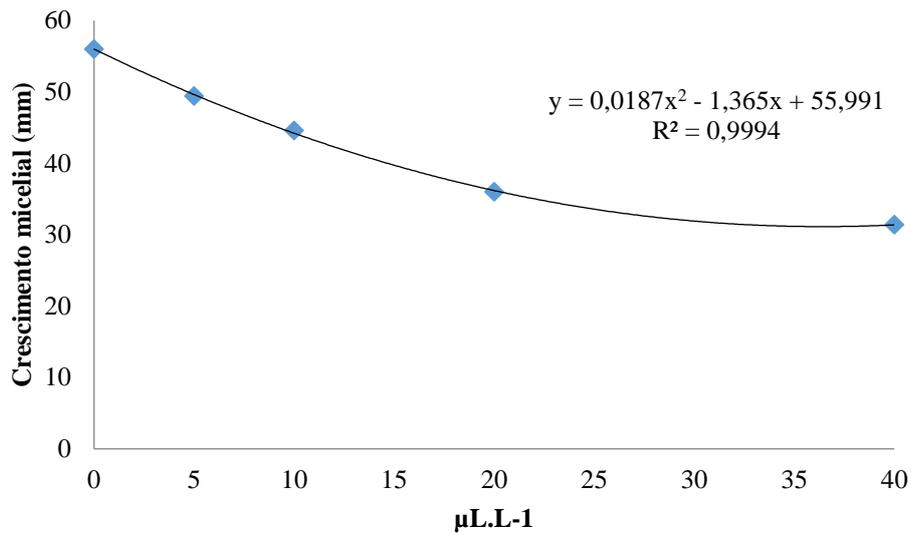
experimento desses autores apresentaram valores de inibição menores que os causados pelos fungicidas comerciais.



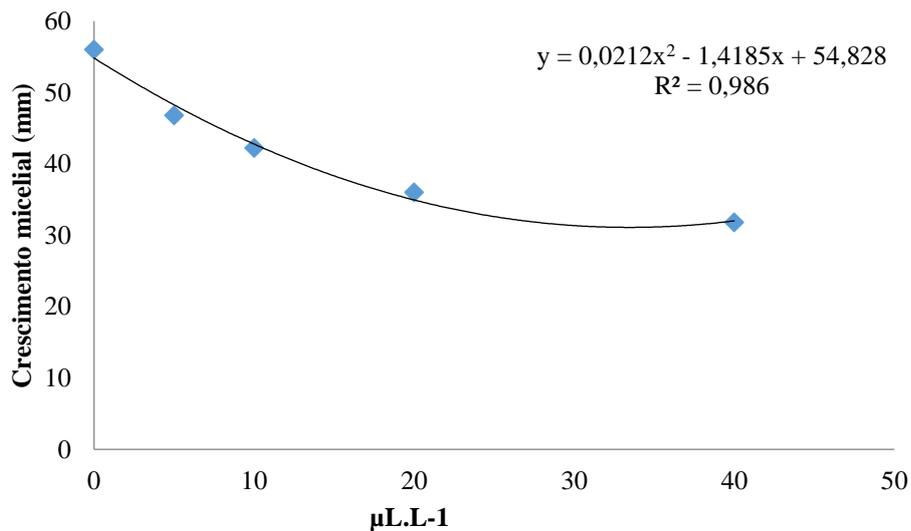
**Figura 06.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Pogostemon cablin*.



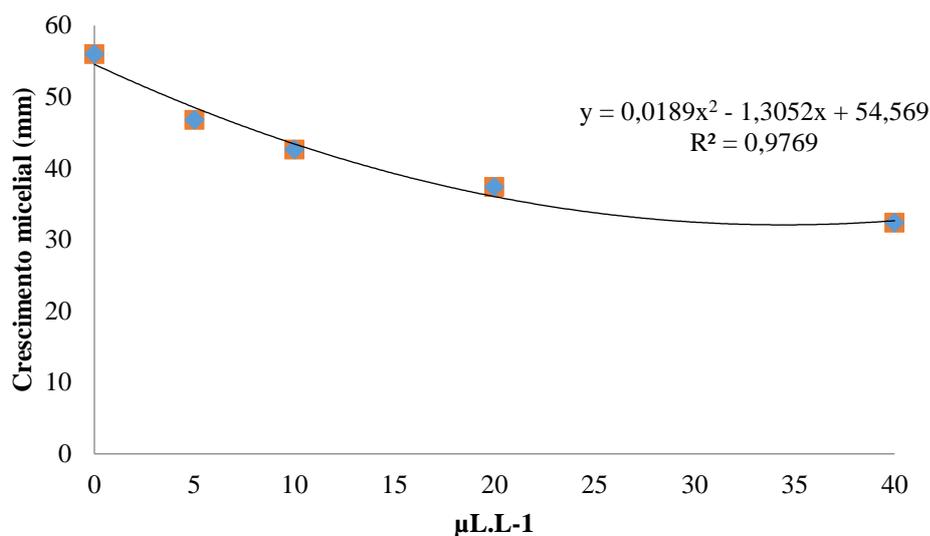
**Figura 07.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*.



**Figura 08.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Santalum album*.



**Figura 09.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Canangium odoratum*.



**Figura 10.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 144 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Mentha crispata*.

Para a avaliação realizada após 168 horas da repicagem os resultados se assemelham muito à avaliação anterior, uma vez que *Pogostemon cablina* apresentou o melhor desempenho inibitório nas concentrações de 5 e 10µL.L<sup>-1</sup>. E todos os óleos não diferiram entre si para as concentrações de 20 e 40 µL.L<sup>-1</sup> (Tabela 3).

**Tabela 3.** Crescimento micelial (mm) in vitro de *Aspergillus flavus* após 168 horas de incubação em meio de cultura acrescido de diferentes óleos essenciais. Mineiros/GO, 2023.

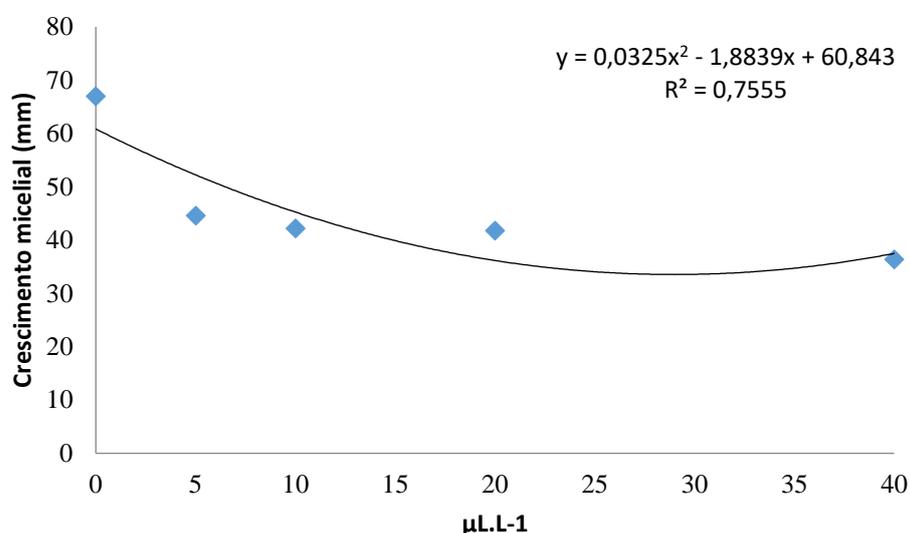
Óleos Essenciais	Crescimento micelial (mm) (média)				
	Concentrações (µL.L <sup>-1</sup> )				
	0	5	10	20	40
<i>Santalum álbum</i>	67,0a	59,4b	55,0c	42,4a	37,6a
<i>Canangium odoratum</i>	67,0a	55,6b	48,4b	41,8a	37,2a
<i>Pogostemon cablin</i>	67,0a	44,6a	42,2a	41,8a	36,4a
<i>Copaifera langsdorffii</i>	67,0a	57,6b	53,4c	44,2a	34,0a
<i>Mentha crispata</i>	67,0a	56,0b	49,2b	43,8a	38,2a

Para cada variável, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Bahrie Dagang (2022) pesquisaram agentes a partir de quatro diferentes óleos essenciais observando seus efeitos antifúngicos em duas espécies diferentes de *Aspergillus*. Os autores constataram, em seus estudos, que o *Pogostemon cablin* apresentou a melhor atividade fungicida, com a inibição de ambos os fungos observada em 400 mg/ml. Os óleos essenciais de *Pogostemon cablin* apresentou 96,70% de efeito inibitório sobre o *A. niger* e 98,55% sobre o *A. fumigatus*. A pesquisa de Keerthiraj et al. (2022) mostrou excelente inibição micelial fúngica,

também do *Pogostemon cablin*, contra cepas virulentas de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.

Quando avaliado o efeito inibitório da dose para cada substância testada, observa-se assim como na avaliação realizada após 168 horas da repicagem que *Pogostemon cablin*, por apresentar a maior eficiência inibitória desde a menor dose testada, apresentou um R<sup>2</sup> relativamente baixo (Figura 11). Para os demais óleos essenciais testados, os índices de R<sup>2</sup> foram acima de 85%, mostrando que há uma relação direta entre o aumento da dose e a taxa de inibição do crescimento micelial fúngico (Figuras 12 a 15).

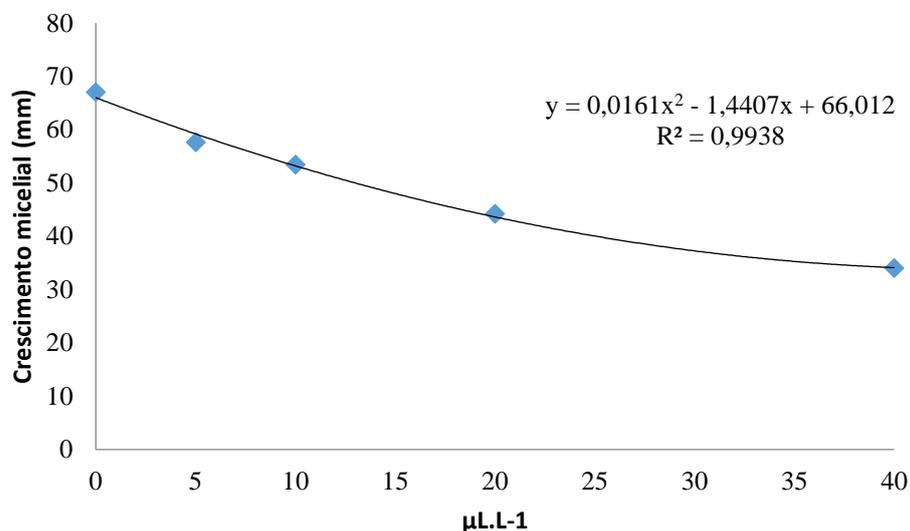


**Figura 11.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Pogostemon cablin*.

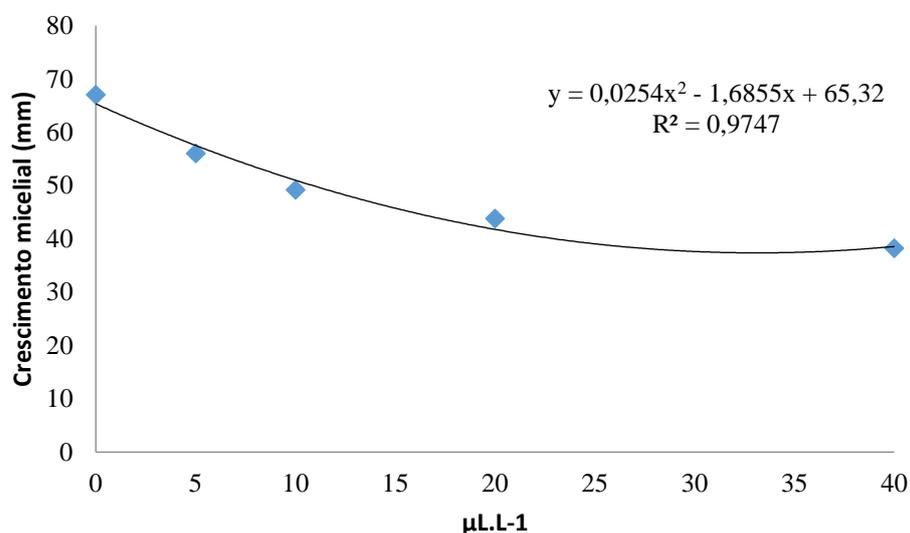
O óleo essencial de *Pogostemon cablin* apresentou excelente atividade antifúngica contra cepas clínicas de *Candida parapsilosis* e *C. albicans*, com Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima entre 4 e 16 µg/mL. O mecanismo de ação envolveu ausência de efeito na parede celular e na membrana plasmática (Cunha et al.,2023). Junren et al. (2021) relacionam o sucesso das ações do *Pogostemon cablin* com vários compostos bioativos encontrados nessa planta, incluindo terpenoides, fitoesteróis, flavonóides, ligninas, glicosídeos, álcoois, pironas e aldeídos. Entre os inúmeros compostos, o álcool de Patchouli, β-patchoulene, patchouleneepoxide, pogostone e pachypodol são de grande importância.

Para os demais óleos testados, assim como o de *Pogostemon cablin*, como observados nas avaliações de 120 e 144 horas após a repicagem, com a avaliação de 168 horas, não foi

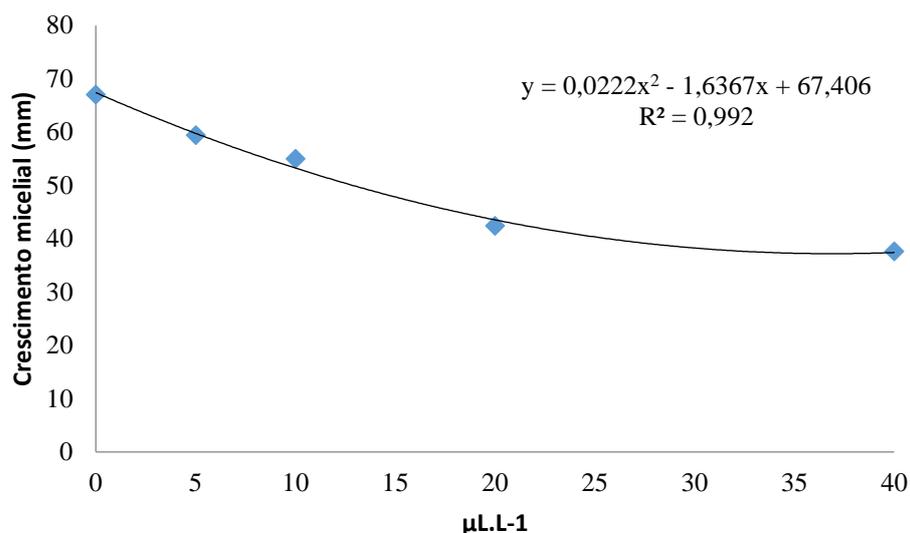
diferente, a eficiência dos óleos utilizados na efetiva inibição do crescimento micelial, é nitidamente observado com o aumento das doses empregadas.



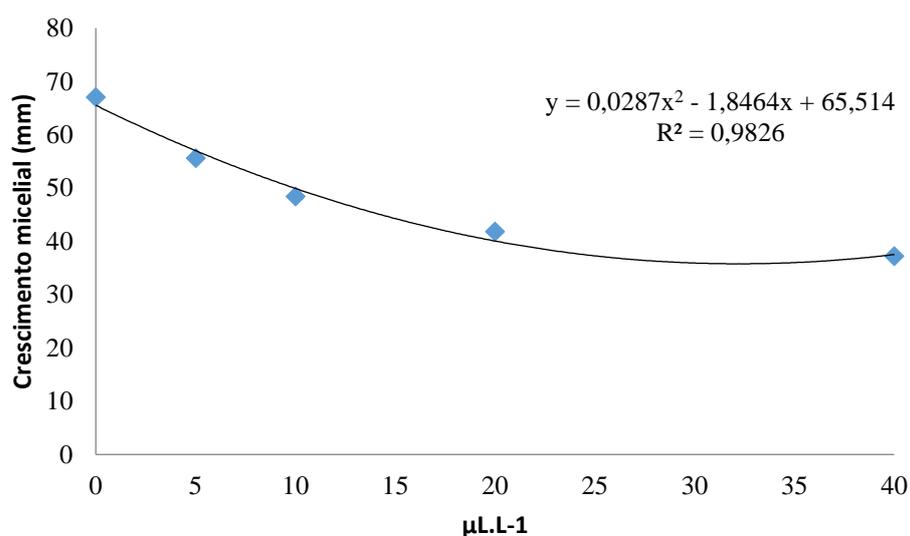
**Figura 12.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii*.



**Figura 13.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Mentha crispata*.



**Figura 14.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Santalum album*.



**Figura 15.** Análise de regressão para a inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* após 168 horas da repicagem em meio de cultura BDA acrescido de diferentes doses do óleo essencial de *Canangium odoratum*.

O fato dos demais óleos essenciais terem apresentado ação antifúngica, pode contribuir para estudos futuros que analisem a combinação entre eles e o próprio *Pogostemon cablin*, na busca por melhores resultados. Neste sentido, Aisyah, Yunita e Amanda (2021) confirmaram que a combinação das misturas de óleo de *Pogostemon cablin* com o óleo de outras plantas, como citronela e noz-moscada, pode aumentar a capacidade inibitória do óleo de *Pogostemon cablin*. Nesse estudo, os autores observaram o aumento do potencial antimicrobiano contra o crescimento de *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Staphylococcus aureus*.

A melhor resposta do óleo essencial observada no presente estudo concorda com as pesquisas de Plesken et al (2015) que testaram diversos tipos de óleos essenciais quanto à atividade antifúngica contra 22 fungos, incluindo 3 leveduras e 19 filamentosos, pelo método de difusão em disco. O óleo de *Pogostemon cablin* inibiu o crescimento de 20 fungos.

No comparativo dos óleos em cada dose, observou-se maior eficiência do *Pogostemon cablin* em comparação aos demais, contudo todos os óleos apresentaram eficiência de inibição conforme o aumento das doses.

## 2.4 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *Canangium odoratum*, *Santalum album*, *Copaifera langsdorffii*, *Mentha crispata* e *Pogostemon cablin* possuem ação inibitória sobre o crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*, sendo *P. cablin* o óleo de maior eficiência dentre os óleos testados.

## 2.5 REFERÊNCIAS

- ADEYEYE, S. A. Fungal mycotoxins in foods: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1213127, ago. 2016.
- AISSAH, Y.; YUNITA, D.; AMANDA, A. Antimicrobial activity of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) citronella (*Cymbopogon nardus*), and nutmeg (*Myristica fragrans*) essential oil and their mixtures against pathogenic and food spoilage microbes. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2021. p. 012020.
- AMINU, M.; KETA, J. N. Study of fungi on stored maize (*Zea mays* L.) in Kebbi State, Nigeria. **Journal of Current Opinion in Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 55-59, mar. 2021.
- BAHRI, Siti Zulaikha Syamsul; DAGANG, Wan Rosmiza Zana Wan. Evaluation of Essential Oils for the Treatments of Indoor Fungi Contaminants. **Proc. Sci. Math.**v.13, p. 158-163, 2022.
- CASTELLARI, C.; MARCOS VALLE, F.; MUTTI, J.; CARDOSO, L.; BARTOSIK, R. Toxigenic fungi in corn (maize) stored in hermetic plastic bags. **Julius-Kühn-Archiv**, n. 425, p. 501-504, jul. 2010.
- CUNHA, S. M. D. et al. Bioprospecting of the antifungal activity of Patchouli essential oil (*Pogostemon cablin* Benth) against strains of the genus *Candida*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2023.
- FATIMA, Sehrish et al. A Comprehensive Review on Pharmacological Activities of Pachypodol: A Bioactive Compound of an Aromatic Medicinal Plant *Pogostemon Cablin* Benth. **Molecules**, v. 28, n. 8, p. 3469, 2023.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

JANTAPAN, Kittika et al. Inhibitory effects of Thai essential oils on potentially aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Biocontrol Science**, v. 22, n. 1, p. 31-40, 2017.

JUNREN, Chen et al. Pharmacological activities and mechanisms of action of Pogostemoncablin Benth: a review. **Chinese Medicine**, v. 16, p. 1-20, 2021.

KEERTHIRAJ, M. et al. Optimisation of patchoulol in the lipid-soluble concentrates of Pogostemoncablin using response surface methodology (RSM) coupled with genetic algorithms (GA). **Industrial Crops and Products**, v. 182, p. 114826, 2022.

KETA, J. N.; ALIERO, A. A.; SHEHU, K.; SUBERU, H. A.; MOHAMMED, N. K.; ABDULKADIR, B. Incidence of fungal flora and aflatoxin content of millet and maize cereal grains sold in Guinea Savanna zones of Kebbi state. **Science World Journal**, v. 14, n. 2, p. 12-15, jun. 2019.

KRO, H. J.; DAS, S.; TAYUNG, K. Fungi associated with contaminated stored grains and their biological control using *Zanthoxylum rhetsa* essential Oil. **International Journal of Advanced Agricultural Science and Technology**, v. 4, n. 11, p. 10-26, nov. 2017.

LUCHESE, Luana A. et al. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of essential oils from *Baccharis dracunculifolia* and Pogostemoncablin against *Fusarium graminearum*. **Natural Product Research**, v. 36, n. 3, p. 849-852, 2022.

MANI-LÓPEZ, Emma; CORTÉS-ZAVALETA, Orlenda; LÓPEZ-MALO, Aurelio. A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. **SN Applied Sciences**, v. 3, p. 1-25, 2021.

NÓBREGA, Lúcia Pinheiro da et al. In vitro fungitoxic potential of copaiba and eucalyptus essential oils on phytopathogens. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 29, n. 3, p. 1-10, 2019.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PANDEY, A. K.; KUMAR, P.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N.; BAJPAI, V. K. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2161, jan. 2017.

PAREEK, Chandresh et al. Antifungal Activity of Different Essential Oils. **Central Asian Journal of Theoretical and Applied Science**, v. 4, n. 2, p. 53-60, 2023.

PLESKEN, Cecilia et al. *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7048-7056, 2015.

RAMSDAM, M. G.; CHAUDHARI, A. K.; SINGH, V. K.; DKHAR, M. S.; KAYANG, H.; DUBEY, N. K.; PRAKASH, B. Antifungal and antioxidant activity of plant based essential oils

on *A. flavus* Link (Trichocomaceae) isolated from stored maize grains of Meghalaya. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, p. 1-16, abr. 2021.

SULEIMAN, R. A.; ROSENTRATER, K. A.; BERN, C. J. Effects of deterioration parameters on storage of maize: A review. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 3, n. 9, p. 147-165, jul. 2013.